

French Publication No. 2 671 405
French Registration No. 91 00064
Published July 10, 1992

Dispositif de mesure du pH d'une cible, procédé, d'utilisation dudit dispositif et ses applications.

Dispositif de mesure du pH d'une cible appropriée notamment une tumeur, sans contact direct avec ladite cible, procédé d'utilisation dudit dispositif ainsi que ses applications, notamment au contrôle du traitement des tumeurs par hyperthermie.

Ce dispositif de mesure du pH comprend:

- une source d'excitation (10) qui comporte une source lumineuse (101) convenable pour la sélection d'au moins deux longueurs d'onde d'excitation de la fluorescence d'un marqueur fluorescent fixé sur ladite cible et dont le spectre d'émission de fluorescence est dépendant du pH, laquelle source est associée à un miroir sphérique (102), un condenseur (103), une lentille (104), des filtres (105), à un moyen de bascule (106) d'une longueur d'onde d'excitation à l'autre et à une lentille (201) qui focalise la lumière sur un moyen de transmission (30) de ladite source lumineuse à la cible (40);
- au moins un moyen de recueil (50) de la fluorescence émise;
- un moyen de détection et de lecture de la fluorescence émise (60, 70, 80); et
- un système de calcul du pH de la cible partir du rapport des signaux de fluorescence émise, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes d'excitation (90).

Abstract Translation

Mechanism for measuring pH of a target,
the process of using said mechanism and its applications.

Mechanism for measuring pH of an appropriate target, notably a tumor, without direct contact with said target, process of using said mechanism as well as its applications, notably monitoring the treatment of tumors by hypothermia.

This mechanism for measuring pH comprises:

- a source of stimulation (10) which comprises a luminous source (101) suitable for the selection of at least two wavelengths of the stimulation of fluorescence from a fluorescent marker fixed on said target and whose spectrum of fluorescent emission is dependent on the pH; said source is associated with a spherical mirror (102), a condenser (103), a lens (104), filters (105), means of toggling (106) from one wavelength of stimulation to the other and to a lens (201) which focuses the light on means of transmission (30) from said luminous source to the target (40);
- at least a means of collecting (50) fluorescent emissions;
- a means of detecting and reading fluorescent emissions (60, 70, 80);
- a system of calculating the pH of a target coming from the relationship of signals of the emitted fluorescence successively obtained at least to said two wavelengths of stimulation (90).

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 671 405

②1 N° d'enregistrement national :

91 00064

⑤1 Int Cl⁵ : G 01 N 21/64, 33/533; G 02 B 23/12, 23/26

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 04.01.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 10.07.92 Bulletin 92/28.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE-INSERM — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Mordon Serge, Maunoury Vincent et
Devoisselle Jean-Marie.

⑦3 Titulaire(s) :

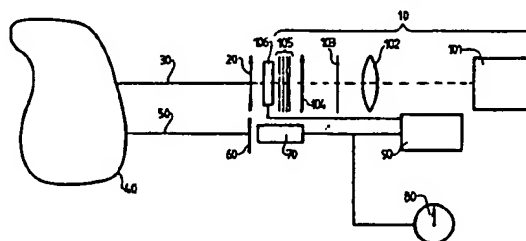
⑦4 Mandataire : Cabinet Ores.

⑤4 Dispositif de mesure du pH d'une cible, procédé d'utilisation dudit dispositif et ses applications.

⑤7 Dispositif de mesure du pH d'une cible appropriée, notamment une tumeur, sans contact direct avec ladite cible, procédé d'utilisation dudit dispositif ainsi que ses applications, notamment au contrôle du traitement des tumeurs par hyperthermie.

Ce dispositif de mesure du pH comprend:

- une source d'excitation (10) qui comporte une source lumineuse (101) convenable pour la sélection d'au moins deux longueurs d'onde d'excitation de la fluorescence d'un marqueur fluorescent fixé sur ladite cible et dont le spectre d'émission de fluorescence est dépendant du pH, laquelle source est associée à un miroir sphérique (102), un condenseur (103), une lentille (104), des filtres (105), à un moyen de bascule (106) d'une longueur d'onde d'excitation à l'autre et à une lentille (201) qui focalise la lumière sur un moyen de transmission (30) de ladite source lumineuse à la cible (40);
- au moins un moyen de recueil (50) de la fluorescence émise;
- un moyen de détection et de lecture de la fluorescence émise (60, 70, 80); et
- un système de calcul du pH de la cible partir du rapport des signaux de fluorescence émise, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes d'excitation (90).



FR 2 671 405 - A1



La présente invention a pour objet un dispositif de mesure du pH d'une cible appropriée, notamment une tumeur, un procédé d'utilisation dudit dispositif ainsi que ses applications, notamment au contrôle du traitement
5 des tumeurs par hyperthermie.

Le dépistage précoce des tumeurs est essentiel pour l'amélioration de leur pronostic ; cependant, les tumeurs d'organes ou de tissus sont souvent difficiles à détecter et, dans le cas du cancer de l'oesophage, par
10 exemple, l'avènement de la fibroscopie oesophagienne, n'a pas amélioré la précocité de son diagnostic.

D'autres méthodes de diagnostic précoces ont été proposées et font appel à plusieurs techniques :

1 - fixation d'un agent de contraste ou d'un
15 agent colorant et diagnostic par imagerie ; l'agent colorant peut soit présenter une grande affinité pour les acides nucléiques (bleu de toluidine, par exemple), soit au contraire ne pas présenter de fixation tumorale (lugol, par exemple, qui ne réagit qu'avec le glycogène
20 de l'épithélium malpighien différencié), soit enfin par l'emploi de photosensibilisateurs présentant un pic de fluorescence lors d'une excitation lumineuse adaptée (photodiagnostic). Ces techniques impliquent l'obtention d'un gradient de fluorescence entre tissu sain et tissu
25 tumoral, qui nécessite la fixation élective ou la rétention particulière du marqueur par la tumeur ; or, celles-ci sont dépendantes de nombreux facteurs et notamment de la vascularisation, de la nécrose et de la capacité phagocytaire de la tumeur.

30 2 - l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou la vectorisation du marqueur par des liposomes ; cette technique, utilisée seule, a l'inconvénient de nécessiter des réactifs spécifiques et coûteux.

3 - l'étude spectrale de la fluorescence
35 émise. Cette dernière méthode, qui ne nécessite pas

l'utilisation de réactifs spécifiques, peut éviter les inconvénients précités.

On peut citer, comme méthodes de diagnostic utilisant l'étude spectrale de la fluorescence émise :

5 - le procédé de diagnostic proposé par S. ANDERSSON-ENGELS et al. (Lasers in Medical Science, 1988, 4, 171-181), qui décrit la localisation et la détection de plaques d'athérome par la mesure de l'autofluorescence induite par un laser comme source
10 d'excitation lumineuse ;

 - le diagnostic des tumeurs par analyse de la fluorescence, qui a notamment été décrit dans :

 . l'article au nom de R.R. ALFANO et al., paru dans J. Quantum Electronics, 1984, vol. OE-20, 12, 1507-
15 1511, qui décrit la mesure de l'autofluorescence induite par une source laser, tant sur les tissus cancéreux que sur les tissus sains et qui montre que les profils spectraux des tissus cancéreux sont différents de ceux des tissus sains.

20 . et les méthodes par fluorescence provoquée, comme précisé dans l'article au nom de A.E. PROFIO et al., paru dans Med. Phys., 1984, 11, 4, 516-520, qui décrit un fluoromètre pour le diagnostic endoscopique de tumeurs. Plus précisément, un dérivé fluorescent de
25 l'hématoporphyrine est injecté, puis on caractérise la tumeur en détectant la fluorescence émise ; la source d'excitation est une lumière violette, acheminée à travers une fibre optique, jusqu'à l'endoscope, alors que la fluorescence émise ainsi que la lumière violette réflé-
30 chie sont collectées par une autre fibre optique. La fluorescence en lumière rouge et en lumière violette sont séparées à l'aide d'un miroir dichroïque et d'un filtre, et détectées à l'aide de photomultiplicateurs. Cette méthode a l'inconvénient de localiser difficilement les
35 petites tumeurs, d'être absolument dépendante des conditions de mesure et le gradient de concentration entre

tissus sain et tumoral est faible avec, de plus, un risque de phototoxicité cutanée.

Les méthodes de diagnostic de tumeurs, par fluorescence, proposées dans l'Art antérieur, ont, de plus, l'inconvénient majeur d'être des techniques abso-
lues, qui entraînent de nombreux faux positifs ou faux négatifs, car elles sont dépendantes des conditions de mesure (position des fibres de recueil, par exemple ou structure du tissu à étudier).

La présente invention s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à un dispositif et à un procédé qui permettent de résoudre le problème de la détection d'une tumeur difficilement détectable par les méthodes de l'Art antérieur ou dont les résultats sont difficilement interprétables, et également de résoudre le problème de la dépendance vis-à-vis des conditions de mesure, rencontrée dans les systèmes proposés dans l'Art antérieur (A.E. PROFIO et al.) ; en effet, la résolution de ce problème est cruciale pour l'obtention de résultats qui sont fiables et permettent d'éviter les faux positifs et les faux négatifs.

Les Inventeurs ont, pour ce faire, utilisé les mesures du métabolisme cellulaire et plus particulièrement la mesure du pH intracellulaire à l'aide de marqueurs fluorescents à spectres dépendants du pH, comme cela a notamment été précisé dans J.A. THOMAS et al., (Biochem., 1979, 18, 2210-2218), qui décrit les caractéristiques spectrales de la fluorescéine et de la 6-carboxyfluorescéine (6-CF), qui sont dépendantes du pH, dans le but de détecter la présence éventuelle d'une tumeur. L'absorbance à 490 nm (pic) en référence à l'absorbance à 465 nm (point isosbestique, c'est-à-dire indépendant du pH) montre que l'absorbance est plus importante à pH 7,8 qu'à pH 6,25.

La présente invention a pour objet un dispositif de mesure du pH d'une cible appropriée, sans contact

direct avec ladite cible, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une source lumineuse convenable pour la sélection d'au moins deux longueurs d'onde d'excitation
- 5 de la fluorescence d'un marqueur fluorescent fixé sur ladite cible et dont le spectre d'émission de fluorescence est dépendant du pH, laquelle source est associée à un commutateur ou moyen de bascule d'une longueur d'onde d'excitation à l'autre ;
- 10 - au moins un moyen de transmission de ladite source lumineuse à la cible ;
- au moins un moyen de recueil de la fluorescence émise ;
- un moyen de détection et de lecture de la
- 15 fluorescence émise ; et
- un système de calcul du pH de la cible à partir du rapport des signaux de fluorescence émise, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes d'excitation.
- 20 Selon un mode de réalisation avantageux dudit dispositif, le moyen de transmission de la source lumineuse comprend au moins une fibre optique.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit dispositif, le moyen de recueil de fluorescence

25 comprend au moins une fibre optique.

On entend, par fibre optique, au sens de la présente invention, toute fibre en matière diélectrique, destinée à guider des ondes électromagnétiques, visibles ou infrarouges, par exemple.

30 Conformément à l'invention ledit moyen de transmission et/ou ledit moyen de recueil sont associés à un endoscope, couplé à un intensificateur d'image, lui-même relié à une caméra vidéo.

On entend, par endoscope, au sens de la présente invention, aussi bien les endoscopes classiques, c'est-à-dire les appareils destinés à éclairer et à

35

rendre visible l'intérieur d'une cavité du corps humain que les fibroscopes, c'est-à-dire les endoscopes souples formés d'un faisceau de fibres optiques extrêmement fines.

5 Selon une disposition avantageuse de ce dernier mode de réalisation, ledit moyen de transmission et/ou ledit moyen de recueil sont inclus dans l'endoscope.

10 Un tel dispositif permet d'obtenir à la fois une image de fluorescence et une image visible de ladite cible.

 Le moyen de mesure des signaux de fluorescence émis par la cible marquée, est avantageusement un spectrophotomètre, et comprend notamment au moins un filtre
15 optique, au moins un photomultiplicateur et/ou au moins un photodétecteur de conversion desdits signaux lumineux, et un moyen d'acheminement des signaux électriques correspondants vers le système de calcul du pH.

 Les marqueurs fluorescents sensibles au pH
20 sont plus particulièrement décrits dans l'article paru au nom de R.Y. TSIEN (Methods in cell Biology, 1989, 30, 127-156), dans lequel il est notamment précisé que les marqueurs fluorescents suivants : la fluorescéine, la fluorescéine conjuguée au dextran ou à une autre molécule
25 inerte (DF), la 5 et/ou 6 carboxyfluorescéine (CF), le 2',7'-bis(carboxyéthyl)-5 et/ou 6-carboxyfluorescéine (BCECF) et leurs esters, la pyramine (8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonate), le 4-méthylumbelliférone ou 4-méthyl-7-hydroxycoumarine (4-MU), le 3,6 dicyano-
30 hydroquinone (DHPN), le SNARF-1 et le SNAF-2 (respectivement le semi-naphtorhodofluor et la semi-naphtofluorescéine), présentent une paire de longueurs d'onde dont le rapport d'excitation augmente avec le pH.

 Ces marqueurs permettent notamment de mesurer
35 le pH du cytosol.

Conformément à l'invention, le marqueur fluorescent est avantageusement associé à des liposomes et/ou des anticorps monoclonaux appropriés.

Selon un autre mode de réalisation du dispositif conforme à l'invention, le système de calcul du pH comprend avantageusement un moyen de calcul du rapport des signaux de fluorescence émise, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes d'excitation, et un moyen de lecture du pH correspondant au rapport obtenu, sur une courbe d'étalonnage dudit marqueur, en fonction du pH.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit système de calcul comprend également un système de contrôle du moyen de bascule.

Un tel système est notamment représenté par un microordinateur approprié, qui permet à la fois d'obtenir le pH en fonction des rapports de signaux de fluorescence émise et de contrôler le moyen de bascule d'une longueur d'onde d'excitation à une autre.

Lorsque la cible est une cellule, un tissu ou un organe, le dispositif conforme à l'invention présente les avantages suivants :

- la mesure du pH est réalisée, *in situ*, sans contact direct avec lesdits cellule, tissu ou organe ;
- cette mesure de pH permet la détection d'une tumeur, car les cellules tumorales présentent un pH plus acide que les cellules normales, dans la mesure où les cellules tumorales sont généralement anoxiques et ont donc recours à la glycolyse anaérobie, avec pour conséquence la production d'acide lactique ;
- cette mesure du pH est fiable, car elle utilise un rapport d'intensités de fluorescence à deux longueurs d'ondes différentes, ce qui évite la dépendance vis-à-vis des paramètres de mesure, (structure de la cible, angle entre la fibre de recueil et la fluorescence émise par la cible, notamment), souvent importante dans

les mesures de fluorescence et ce qui permet d'obtenir des signaux de bonne qualité et éventuellement de les amplifier.

La présente invention a également pour objet
5 un dispositif pour le traitement des tumeurs par hyperthermie et le contrôle de l'hyperthermie, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif de mesure de pH conforme à l'invention, associé à un moyen de chauffage approprié de ladite tumeur.

10 Ledit moyen de chauffage est avantageusement choisi parmi l'un quelconque des moyens suivants : source laser, micro-ondes, ultra-sons, radiofréquence ou circuit d'eau chaude.

Conformément à l'invention, ledit moyen de
15 chauffage est notamment associé à un moyen de focalisation de la chaleur produite, vers la tumeur, notamment une sonde, un cathéter ou une antenne extérieure.

La présente invention a également pour objet un procédé d'utilisation du dispositif conforme à
20 l'invention, permettant d'obtenir les informations caractéristiques de l'évolution dans le temps du pH d'une cible appropriée, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de la cible à analyser avec un marqueur fluorescent, présentant, au moins deux
25 pics d'excitation et un pic d'émission et dont le spectre d'émission est dépendant du pH ;

- l'excitation de la cible ainsi traitée, successivement auxdites longueurs d'onde d'excitation dudit marqueur fluorescent ;

- la mesure de la fluorescence émise par
30 ladite cible à analyser, successivement auxdites longueurs d'onde d'excitation ; et

- le calcul du pH de ladite cible à analyser à partir du rapport des signaux de fluorescence émis, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs
35 d'onde d'excitation, par la lecture du pH correspondant

au rapport obtenu, sur une courbe d'étalonnage dudit marqueur, en fonction du pH.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, préalablement à la mise en contact de la
5 cible à analyser avec le marqueur fluorescent, ladite cible est mise en contact avec un sucre, notamment du glucose.

La mise en contact de la cible avec le sucre rend le procédé encore plus sensible, dans la mesure où
10 il permet de diminuer encore le pH des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains et donc d'augmenter ainsi la différence entre tissu tumoral et tissu sain.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, le marqueur fluorescent est notamment
15 choisi dans le groupe qui comprend la fluorescéine, la fluorescéine conjuguée au dextran ou à une autre molécule inerte (DF), la 5 et/ou 6 carboxyfluorescéine (CF), le 2',7'-bis(carboxyéthyl)-5 et/ou 6-carboxyfluorescéine (BCECF) et leurs esters, la pyramine (8-hydroxypyrrène-
20 1,3,6-trisulfonate), le 4-méthylumbellifère ou 4-méthyl-7-hydroxycoumarine (4-MU), le 3,6 dicyano-hydroquinone (DHPN), le SNARF-1 et le SNAF-2 (respectivement le semi-naphtorhodofluor et la semi-naphtofluorescéine).

25 Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, ledit marqueur fluorescent est associé à des liposomes et/ou des anticorps monoclonaux appropriés.

Les dispositifs et le procédé conformes à
30 l'invention s'appliquent de manière particulièrement avantageuse à la mesure du pH de tumeurs, notamment accessibles uniquement par voie endoscopique et permettent de suivre le pH de la tumeur en différents points et l'évolution du traitement par hyperthermie desdites
35 tumeurs, ce qui rend possible le calcul de la dose thermique utile, en n'importe quel point de la tumeur ; en

effet, la dose thermique à appliquer est différente selon le pH.

Le dispositif conforme à l'invention permet également le contrôle en temps réel de la dose thermique
5 à appliquer.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé
10 conforme à l'invention et à une description détaillée du dispositif selon l'invention, avec référence aux dessins annexés, dans lesquels :

- les figures 1 et 2 représentent schématiquement deux mode de réalisation d'un dispositif de mesure
15 du pH conforme à l'invention ;

- la figure 3 représente le profil cinétique de fluorescence de deux cibles saines (S_1 et S_2) ;

- la figure 4 représente l'effet du 5,6-CF sur les valeurs du rapport d'intensités de fluorescence d'émission de deux zones saines de la peau, calculé à
20 partir des intensités de fluorescence obtenues à 490 et 465 nm ;

- la figure 5 représente le profil cinétique de fluorescence de tissus normaux et tumoraux après une
25 injection de 250 μ l de 5,6-CF à 10^{-3} M ;

- la figure 6 représente l'effet d'un tissu sain ou d'un tissu tumoral sur les valeurs des rapports d'intensités de fluorescence, calculés à partir des intensités obtenues à 490 et 465 nm ;

- la figure 7 représente l'évolution du spectre d'émission de fluorescence du 5,6-CF en fonction du pH ;
30

- la figure 8 représente la courbe de calibration de la 6 CF en fonction du pH ;

- la figure 9 montre l'influence du pH sur un traitement par hyperthermie.
35

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

5 La figure 1 représente une vue schématique d'un dispositif de mesure de pH conforme à l'invention, comprenant :

 - une source d'excitation 10, qui dans la réalisation représentée, et ce de manière non limitative, 10 comporte une lampe à arc USHIO 155 XENON (USHIO, JAPON) 101, un miroir sphérique de rayon de courbure 3 cm 102, un condenseur 66061 ORIEL 103 (ORIEL, USA), une lentille convergente de diamètre 7,5 cm et de distance focale 200 mm 104, et des filtres interférentiels 105 centrés 15 sur 450 nm, 465 nm, 490 nm et 500 nm, permettant de sélectionner les longueurs d'onde désirées ; un moyen de bascule 106 ou commutateur permet de basculer d'une longueur d'onde d'excitation à une autre ; une dernière lentille 20, de diamètre 22,4 mm permet de focaliser la 20 lumière sur le coeur d'une fibre 600 μ m de transmission 30 (O.N. = 0,48). La puissance délivrée est de 3 mW sur une bande de 10 nm. La fibre de transmission est au contact de la cible 40, notamment un tissu, dont le pH est à analyser *in situ* ;

25 - une fibre de recueil 50, d'un diamètre de 600 μ m, est connectée à un monochromateur MC1-03 (OPTOMETRICS, USA) 60 relié, à un photomultiplicateur 70 (MINI-CHROM ; bande 300 nm à 800 nm) ;

 - la lecture du signal s'effectue, dans la 30 réalisation représentée sur un voltmètre DIPITOL 80 ;

 - le système de calcul est représenté par un microordinateur 90, auquel sont reliés le système de recueil (fibre de recueil 50, monochromateur 60 et photomultiplicateur 70) et le moyen de bascule 106.

35 Le système de calcul permet le calcul du rapport des signaux de fluorescence émise obtenus à deux

longueurs d'excitation appropriées au marqueur utilisé, puis le calcul du pH de la cible 40 correspondant au rapport obtenu, sur une courbe d'étalonnage dudit marqueur en fonction du pH.

5 La figure 2 représente une vue schématique d'un dispositif de mesure de pH conforme à l'invention, dans lequel la fibre de recueil 50' est incluse dans un endoscope 51 qui permet ainsi d'obtenir à la fois une image de fluorescence et une image dans le visible.

10 Le dispositif représenté à la figure 2 comprend :

.. une source d'excitation de fluorescence 10', dont les caractéristiques peuvent être identiques à celle de la source décrite à l'exemple 1, qui est associée à un commutateur de longueur d'onde d'excitation 106', qui
15 peut avantageusement être contrôlé par un ordinateur 901 ; le commutateur 106' est relié à la cible 40' par l'intermédiaire d'une fibre de transmission 30' de même type que celle de l'exemple 1 ;

20 . un endoscope 51, qui comprend une source lumineuse 501, un obturateur 502 et un faisceau de fibres appropriées 503;

.. une fibre de recueil 50', qui est incluse dans un endoscope 51, est associée à un filtre 61 de
25 sélection de la longueur d'onde d'émission (515 nm, lorsque le marqueur est la 6-CF, par exemple) ou à un monochromateur; elle est couplée d'une part à un intensificateur d'image 52, lui-même relié à une caméra 53 et d'autre part à une caméra vidéo 54, qui permet
30 l'obtention d'une image de la cible.

Les signaux de fluorescence (image de fluorescence) et l'image dans le visible sont dirigées vers le microordinateur 901.

Le système de recueil (fibre de recueil 50',
35 filtre 61 ou monochromateur, intensificateur d'image 52, caméra 53), l'endoscope 51, la caméra vidéo 54 et

l'ordinateur 901 constituent un système d'imagerie qui permet à la fois le stockage d'images et de spectres de fluorescence.

Les dispositifs conformes à l'invention, permettent la mesure du pH d'une cible.

On procède comme suit : la mesure est réalisée sur des souris CDF porteuses d'une leucémie lymphoïde P388.

La tumeur est greffée en sous-cutané sur un côté de la souris.

L'évolution spontanée de la tumeur est reproductible : une tumeur d'un diamètre de 20 mm est obtenue 12 jours après la greffe.

Une injection intrapéritonéale de 250 μ l de 5,6-CF dans un tampon NaCl 0,9 % à une concentration de 10^{-3} M, 5.10^{-3} M ou 10^{-4} M (5 mg/kg, 2,5 mg/kg ou 0,5 mg/kg), est réalisée au jour 12.

Avant de mesurer la fluorescence et de calculer le pH de la tumeur, la zone tumorale et un tissu sain correspondant sont rasés.

L'injection de 5,6 CF étant considérée comme le temps zéro, les intensités de fluorescence sont mesurées aux temps -3 minutes, +3 minutes, puis toutes les 10 minutes, pendant 1 heure.

Des essais contrôles sont réalisés sur la peau normale et sur des tumeurs, n'ayant pas été mises en contact avec le marqueur fluorescent.

La figure 3, qui comporte en abscisse, le temps en minutes et en ordonnées, les intensités de fluorescence, montre les différents profils cinétiques entre deux zones de tissus sains (S1 et S2). Les intensités de fluorescence maximales peuvent être relativement différentes ; les intensités maximales sont atteintes en 5 à 30 minutes, mais sont différentes pour chaque tissu. Les différences dans les profils cinétiques peuvent être dues notamment à des perturbations dans les conditions de

détection dans les deux zones. Les courbes 1 et 2 montrent les profils cinétiques du tissu S2, respectivement à 465 et 490 nm et les courbes 3 et 4 montrent les profils cinétiques du tissu S1, respectivement à 465 et à 5 490 nm.

La figure 4 montre que quelles que soient les intensités de fluorescence dans les deux zones, les différences n'affectent pas les valeurs des rapports, qui restent constants et sont quasiment identiques pour les 10 deux zones S1 et S2 entre 15 min et 50 min après l'injection.

La figure 5 montre les intensités de fluorescences obtenues en fonction du temps, sur un tissu sain (-□-) et sur un tissu tumoral (-■-). Cette figure donne 15 les profils cinétiques obtenus après injection de CF à 10^{-3} M. La fluorescence des tissus normaux est supérieure à celle des tissus tumoraux.

La figure 6 montre les valeurs des rapports I490/I465 et montrent qu'il existe bien une différence 20 significative entre les tissus sains et les tissus tumoraux.

Les résultats montrent que la pénétration de la lumière d'excitation est suffisante pour détecter les variations spectrales de fluorescence par la méthode des 25 rapports et permettent d'obtenir la valeur du pH au niveau de la tumeur ; en effet, la figure 7 montre l'évolution du spectre d'émission de fluorescence de la carboxyfluorescéine en fonction du pH et la figure 8 montre la courbe d'étalonnage de la 5,6 CF en fonction du 30 pH.

Le procédé conforme à l'invention permet également d'évaluer la dose thermique (durée et temps) nécessaire pour détruire des cellules tumorales en fonction du pH desdites cellules.

La figure 9 montre l'influence du pH sur la résistance de cultures de cellules soumises à une hyperthermie.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède,
5 l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent
venir à l'esprit du technicien en la matière, sans
10 s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1. Dispositif de mesure du pH d'une cible appropriée sans contact direct avec ladite cible, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 - une source lumineuse (101) convenable pour la sélection d'au moins deux longueurs d'onde d'excitation de la fluorescence d'un marqueur fluorescent fixé sur ladite cible et dont le spectre d'émission de fluorescence est dépendant du pH, laquelle source est
10 associée à un moyen de bascule (106, 106') d'une longueur d'onde d'excitation à l'autre ;
- au moins un moyen de transmission (30, 30') de ladite source lumineuse à la cible (40, 40') ;
- au moins un moyen de recueil (50, 50') de la
15 fluorescence émise ;
- un moyen de détection et de lecture de la fluorescence émise (60, 70, 80 ; 61,52,53) ; et
- un système de calcul du pH de la cible à partir du rapport des signaux de fluorescence émise,
20 obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes d'excitation (90, 901).

2. Dispositif selon la revendication 1; caractérisé en ce que le moyen de transmission de la source lumineuse comprend au moins une fibre optique.

- 25 3. Dispositif selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que le moyen de recueil de fluorescence comprend au moins une fibre optique.

4. Dispositif selon l'une quelconque des
30 revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit moyen de transmission et/ou ledit moyen de recueil sont associés à un endoscope (51), couplé à un intensificateur d'image (52), lui-même relié à une caméra vidéo (53).

5. Dispositif selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit moyen de transmission et/ou ledit
35 moyen de recueil sont inclus dans l'endoscope.

6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est avantageusement associé à des liposomes et/ou des anticorps monoclonaux appropriés.

5 7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le système de calcul du pH comprend avantageusement un moyen de calcul du rapport des signaux de fluorescence émise, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes
10 d'excitation, et un moyen de lecture du pH correspondant au rapport obtenu, sur une courbe d'étalonnage dudit marqueur, en fonction du pH.

8. Dispositif selon la revendication 7, caractérisé en ce que le système de calcul comprend également
15 un système de contrôle du moyen de bascule.

9. Dispositif pour le traitement des tumeurs par hyperthermie et le contrôle de l'hyperthermie, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif de mesure de pH selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, associé
20 à un moyen de chauffage approprié de ladite tumeur.

10. Dispositif selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit moyen de chauffage est associé à un moyen de focalisation de la chaleur produite, notamment une sonde, un cathéter ou une antenne exté-
25 rieure.

11. Procédé d'utilisation du dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, permettant d'obtenir les informations caractéristiques de l'évolution dans le temps du pH d'une cible appropriée,
30 caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de la cible à analyser avec un marqueur fluorescent, présentant, au moins deux pics d'excitation et un pic d'émission et dont le spectre d'émission est dépendant du pH ;

- l'excitation de la cible ainsi traitée, successivement auxdites longueurs d'onde d'excitation dudit marqueur fluorescent ;

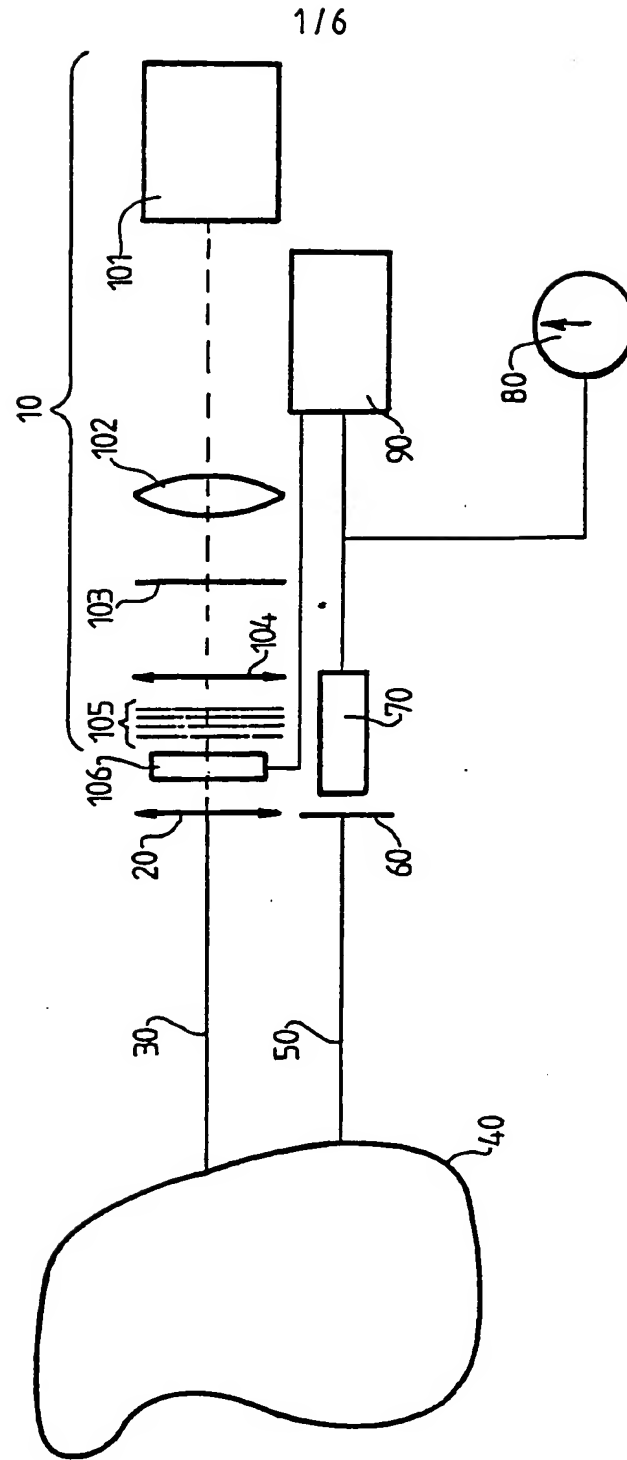
5 - la mesure de la fluorescence émise par ladite cible à analyser, successivement auxdites longueurs d'onde d'excitation ; et

10 - le calcul du pH de ladite cible à analyser à partir du rapport des signaux de fluorescence émis, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'onde d'excitation, par la lecture du pH correspondant au rapport obtenu, sur une courbe d'étalonnage dudit marqueur, en fonction du pH.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que préalablement à la mise en contact de la
15 cible à analyser avec le marqueur fluorescent, ladite cible est mise en contact avec un sucre, notamment du glucose.

13. Procédé selon la revendication 11 ou la revendication 12, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est notamment choisi dans le groupe qui comprend
20 la fluorescéine, la fluorescéine conjuguée au dextran ou à une autre molécule inerte (DF), la 5 et/ou 6 carboxyfluorescéine (CF), le 2',7'-bis(carboxyéthyl)-5 et/ou 6-carboxyfluorescéine (BCECF) et leurs esters, la pyramine
25 (8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonate), le 4-méthylumbellifère ou 4-méthyl-7-hydroxycoumarine (4-MU), le 3,6-dicyanohydroquinone (DHPN), le SNARF-1 et le SNAF-2 (respectivement le semi-naphtorhodofluor et la semi-naphtofluorescéine).

30 14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit marqueur fluorescent est associé à des liposomes et/ou des anticorps monoclonaux appropriés.

FIG. 1

2 / 6

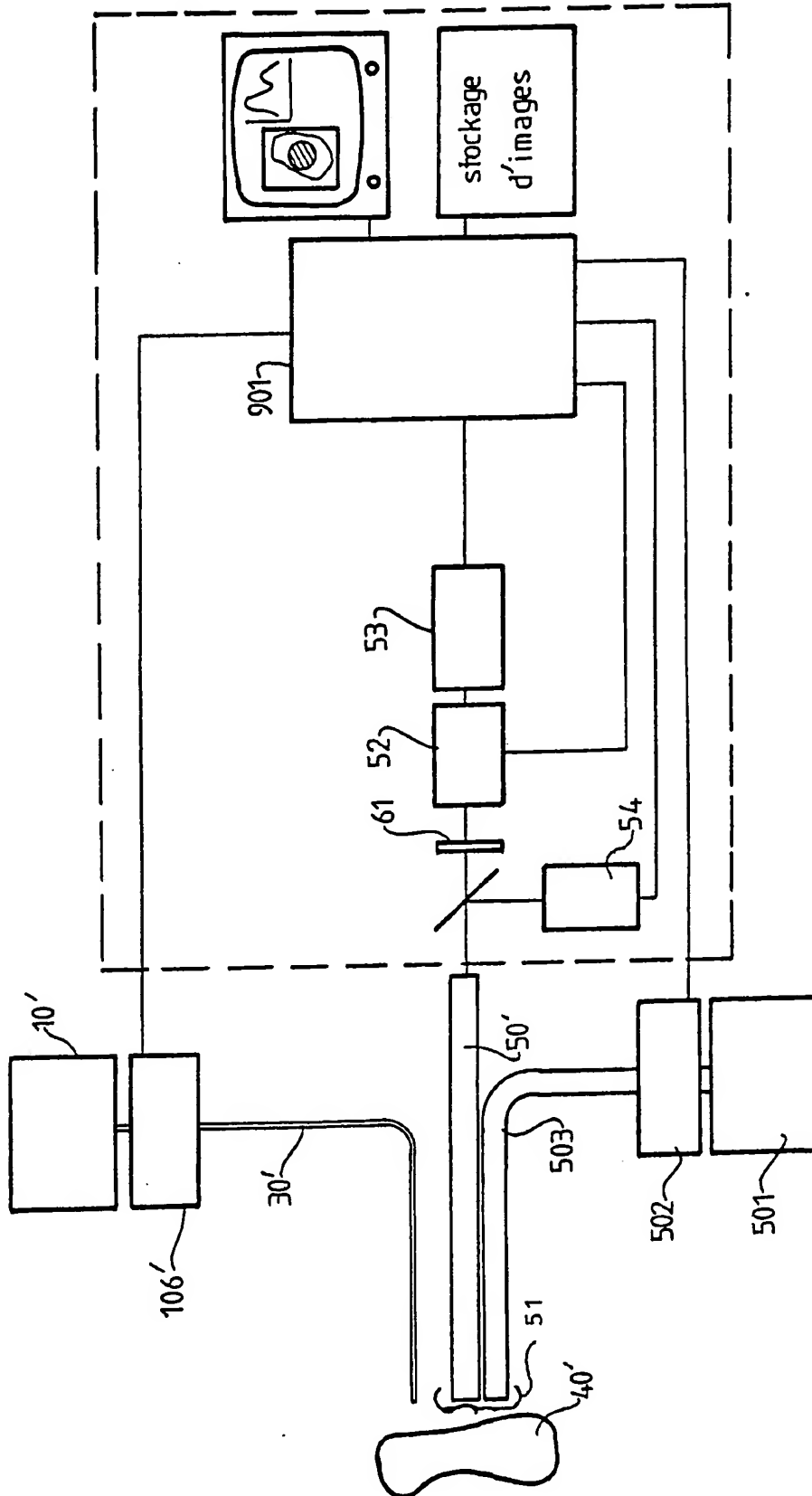
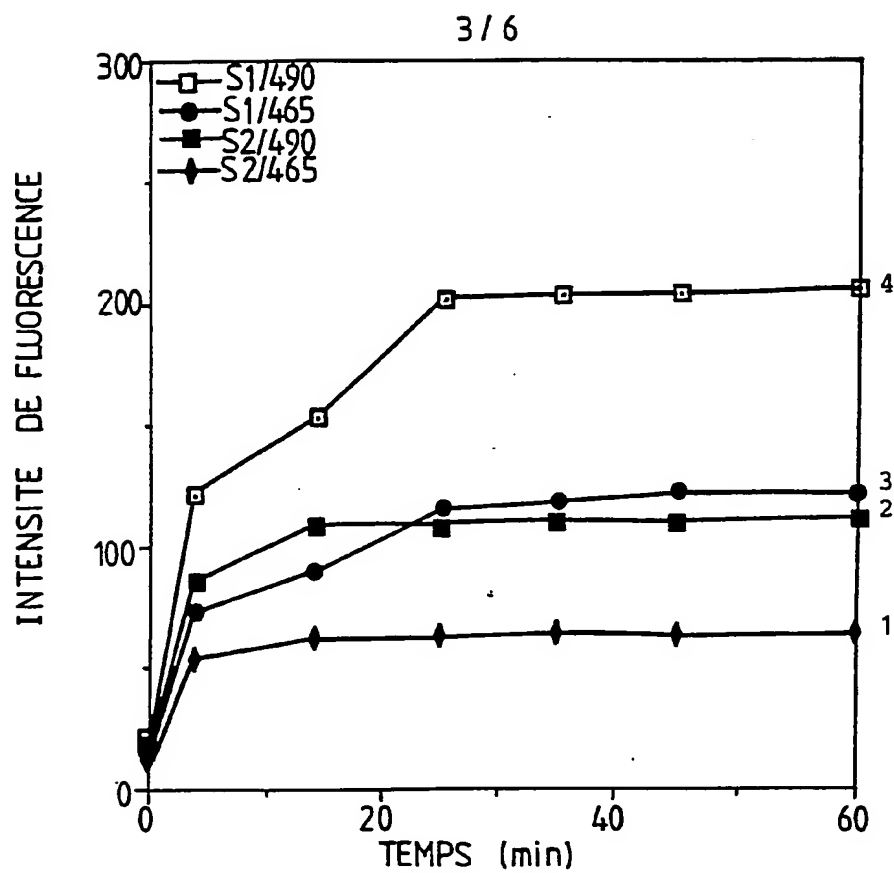
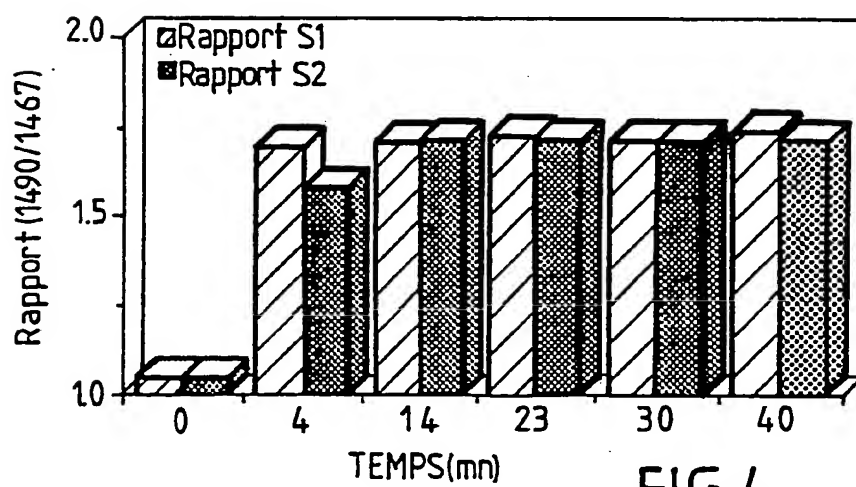
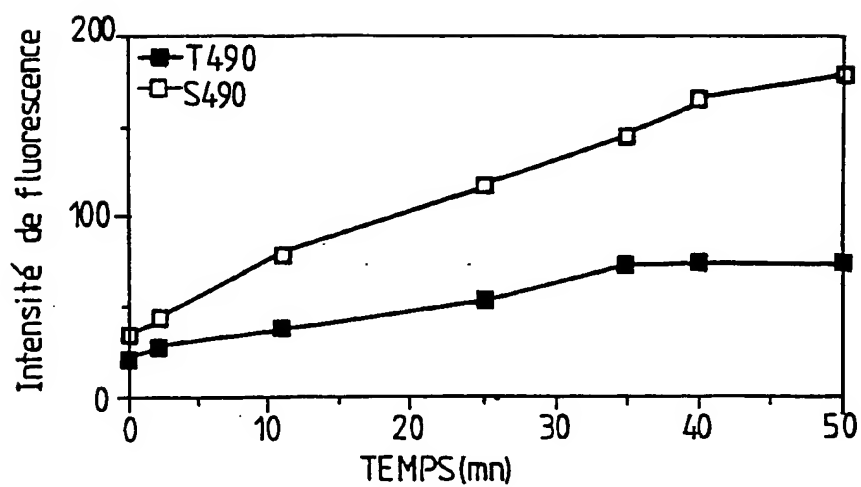
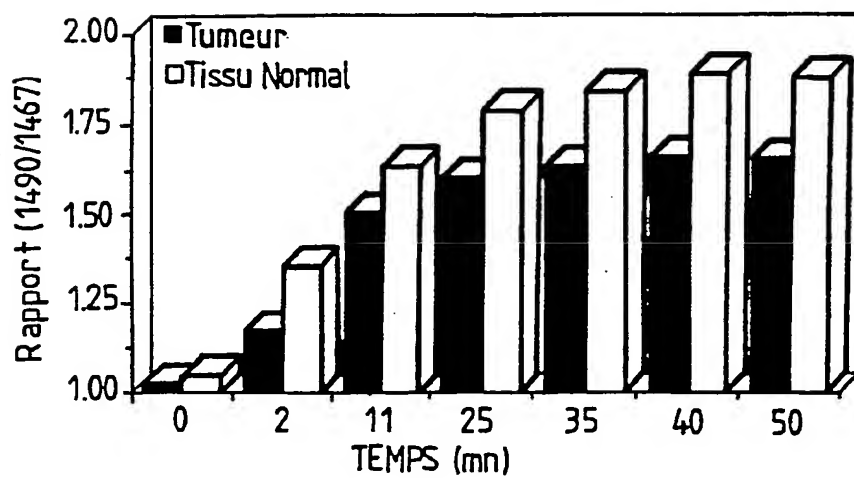


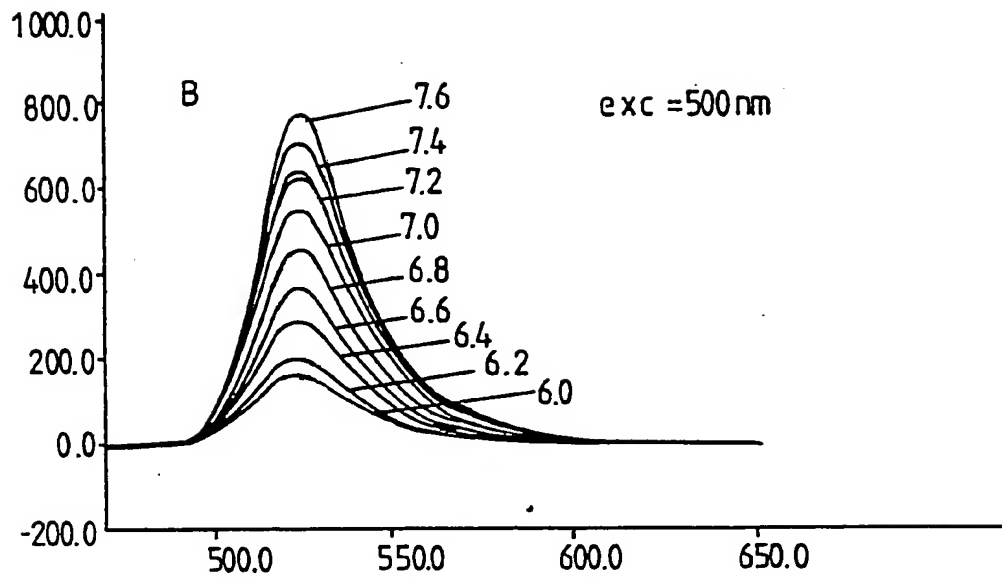
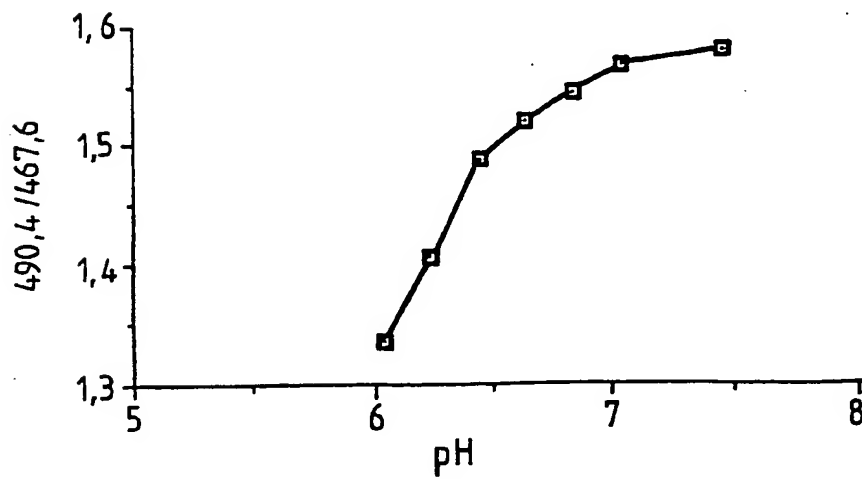
FIG. 2

FIG.3FIG.4

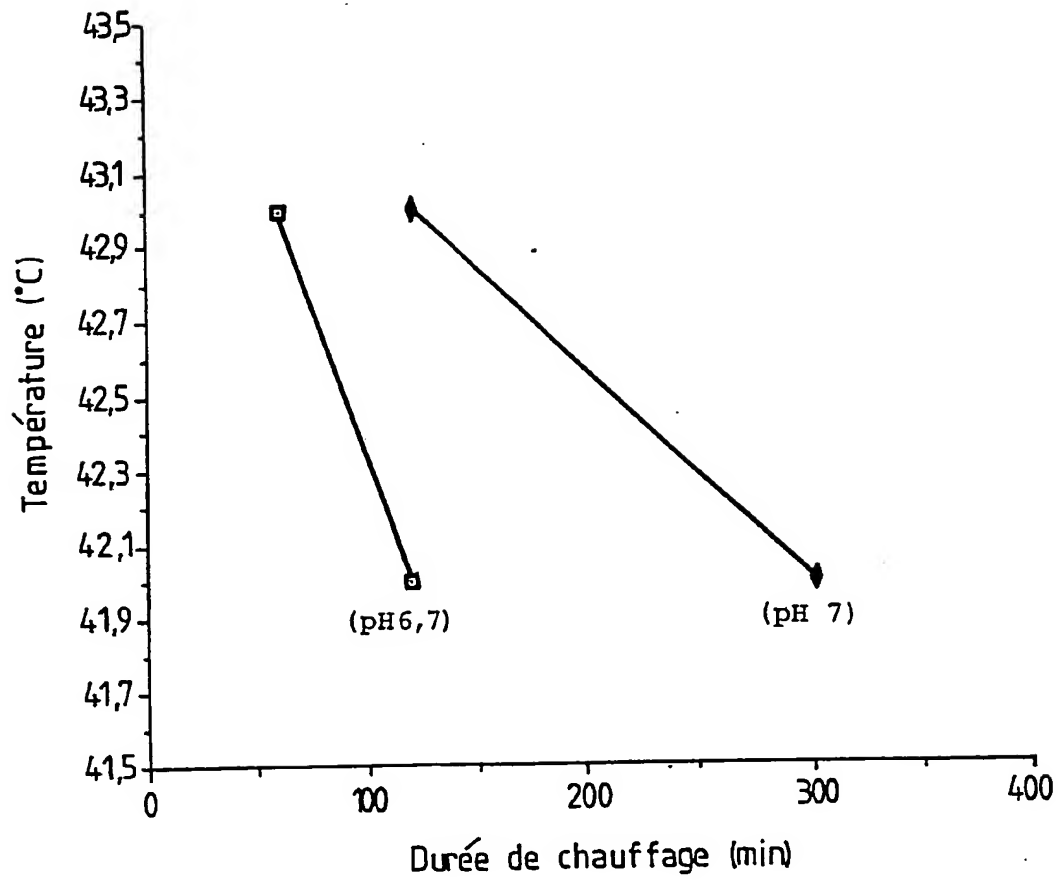
4/6

FIG.5FIG.6

5/6

FIG.7FIG.8

6/6

FIG.9

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9100064
FA 451867

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	US-A-4 768 513 (S. SUZUKI) * colonnes 1,2; colonne 7, revendications 11-13; figure 4 * ---	1-5,9, 11
Y	MEDICAL & BIOLOGICAL ENGINEERING & COMPUTING vol. 25, no. 6, novembre 1987, pages 597-604, Stevenage, Herts, GB; M.J. MARTIN et al.: "Fibre-optics and optical sensors in medicine" * page 597; page 601, paragraphe 6.1 * ---	1-5,9, 11
A,D	D. LANSING TAYLOR et al.: "METHODS IN CELL BIOLOGY" vol. 30, partie B, pages 127-156, 1989, Academic Press * pages 131-140 * ---	13
Y	GB-A-2 126 717 (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) * document entier * ---	1-5,9, 11
Y	IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING vol. BME-33, no. 2, février 1986, pages 117-132; J.L. GEHRICH et al.: "Optical Fluorescence and Its Application to an Intravascular Blood Gas Monitoring System" * page 120; figure 6 * ---	1-5,9, 11
A	US-A-4 973 848 (A.S. KOLOBANOV et al.) * colonne 11, ligne 62 - colonne 12, ligne 43 * ---	9,10
A	WO-A-8 404 665 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) * document entier * ---	1
		-/-
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
20-09-1991		BRISON O.P.
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9100064
FA 451867

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO-A-9 010 219 (ANDERSSON-ENGELS et al.) * document entier * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 20-09-1991		Examinateur BRISON O.P.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant		

French Publication No. 2 671 405
French Registration No. 91 00064
Published July 10, 1992

Dispositif de mesure du pH d'une cible, procédé, d'utilisation dudit dispositif et ses applications.

Dispositif de mesure du pH d'une cible appropriée notamment une tumeur, sans contact direct avec ladite cible, procédé d'utilisation dudit dispositif ainsi que ses applications, notamment au contrôle du traitement des tumeurs par hyperthermie.

Ce dispositif de mesure du pH comprend:

- une source d'excitation (10) qui comporte une source lumineuse (101) convenable pour la sélection d'au moins deux longueurs d'onde d'excitation de la fluorescence d'un marqueur fluorescent fixé sur ladite cible et dont le spectre d'émission de fluorescence est dépendant du pH, laquelle source est associée à un miroir sphérique (102), un condenseur (103), une lentille (104), des filtres (105), à un moyen de bascule (106) d'une longueur d'onde d'excitation à l'autre et à une lentille (201) qui focalise la lumière sur un moyen de transmission (30) de ladite source lumineuse à la cible (40);
- au moins un moyen de recueil (50) de la fluorescence émise;
- un moyen de détection et de lecture de la fluorescence émise (60, 70, 80); et
- un système de calcul du pH de la cible partir du rapport des signaux de fluorescence émise, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes d'excitation (90).

Abstract Translation

Mechanism for measuring pH of a target,
the process of using said mechanism and its applications.

Mechanism for measuring pH of an appropriate target, notably a tumor, without direct contact with said target, process of using said mechanism as well as its applications, notably monitoring the treatment of tumors by hypothermia.

This mechanism for measuring pH comprises:

- a source of stimulation (10) which comprises a luminous source (101) suitable for the selection of at least two wavelengths of the stimulation of fluorescence from a fluorescent marker fixed on said target and whose spectrum of fluorescent emission is dependent on the pH; said source is associated with a spherical mirror (102), a condenser (103), a lens (104), filters (105), means of toggling (106) from one wavelength of stimulation to the other and to a lens (201) which focuses the light on means of transmission (30) from said luminous source to the target (40);
- at least a means of collecting (50) fluorescent emissions;
- a means of detecting and reading fluorescent emissions (60, 70, 80);
- a system of calculating the pH of a target coming from the relationship of signals of the emitted fluorescence successively obtained at least to said two wavelengths of stimulation (90).

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 671 405

②1 N° d'enregistrement national :

91 00064

⑤1 Int Cl⁵ : G 01 N 21/64, 33/533; G 02 B 23/12, 23/26

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 04.01.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 10.07.92 Bulletin 92/28.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE-INSERM — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Mordon Serge, Maunoury Vincent et
Devoisselle Jean-Marie.

⑦3 Titulaire(s) :

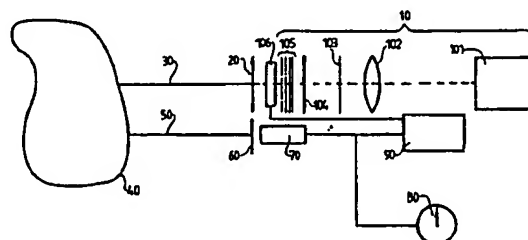
⑦4 Mandataire : Cabinet Ores.

⑤4 Dispositif de mesure du pH d'une cible, procédé d'utilisation dudit dispositif et ses applications.

⑤7 Dispositif de mesure du pH d'une cible appropriée, notamment une tumeur, sans contact direct avec ladite cible, procédé d'utilisation dudit dispositif ainsi que ses applications, notamment au contrôle du traitement des tumeurs par hyperthermie.

Ce dispositif de mesure du pH comprend:

- une source d'excitation (10) qui comporte une source lumineuse (101) convenable pour la sélection d'au moins deux longueurs d'onde d'excitation de la fluorescence d'un marqueur fluorescent fixé sur ladite cible et dont le spectre d'émission de fluorescence est dépendant du pH, laquelle source est associée à un miroir sphérique (102), un condenseur (103), une lentille (104), des filtres (105), à un moyen de bascule (106) d'une longueur d'onde d'excitation à l'autre et à une lentille (201) qui focalise la lumière sur un moyen de transmission (30) de ladite source lumineuse à la cible (40);
- au moins un moyen de recueil (50) de la fluorescence émise;
- un moyen de détection et de lecture de la fluorescence émise (60, 70, 80); et
- un système de calcul du pH de la cible partir du rapport des signaux de fluorescence émise, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes d'excitation (90).



FR 2 671 405 - A1



La présente invention a pour objet un dispositif de mesure du pH d'une cible appropriée, notamment une tumeur, un procédé d'utilisation dudit dispositif ainsi que ses applications, notamment au contrôle du traitement
5 des tumeurs par hyperthermie.

Le dépistage précoce des tumeurs est essentiel pour l'amélioration de leur pronostic ; cependant, les tumeurs d'organes ou de tissus sont souvent difficiles à détecter et, dans le cas du cancer de l'oesophage, par
10 exemple, l'avènement de la fibroscopie oesophagienne, n'a pas amélioré la précocité de son diagnostic.

D'autres méthodes de diagnostic précoces ont été proposées et font appel à plusieurs techniques :

1 - fixation d'un agent de contraste ou d'un
15 agent colorant et diagnostic par imagerie ; l'agent colorant peut soit présenter une grande affinité pour les acides nucléiques (bleu de toluidine, par exemple), soit au contraire ne pas présenter de fixation tumorale (lugol, par exemple, qui ne réagit qu'avec le glycogène
20 de l'épithélium malpighien différencié), soit enfin par l'emploi de photosensibilisateurs présentant un pic de fluorescence lors d'une excitation lumineuse adaptée (photodiagnostic). Ces techniques impliquent l'obtention d'un gradient de fluorescence entre tissu sain et tissu
25 tumoral, qui nécessite la fixation élective ou la rétention particulière du marqueur par la tumeur ; or, celles-ci sont dépendantes de nombreux facteurs et notamment de la vascularisation, de la nécrose et de la capacité phagocytaire de la tumeur.

30 2 - l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou la vectorisation du marqueur par des liposomes ; cette technique, utilisée seule, a l'inconvénient de nécessiter des réactifs spécifiques et coûteux.

3 - l'étude spectrale de la fluorescence
35 émise. Cette dernière méthode, qui ne nécessite pas

l'utilisation de réactifs spécifiques, peut éviter les inconvénients précités.

On peut citer, comme méthodes de diagnostic utilisant l'étude spectrale de la fluorescence émise :

- 5 - le procédé de diagnostic proposé par S. ANDERSSON-ENGELS et al. (Lasers in Medical Science, 1988, 4, 171-181), qui décrit la localisation et la détection de plaques d'athérome par la mesure de l'autofluorescence induite par un laser comme source
10 d'excitation lumineuse ;
 - le diagnostic des tumeurs par analyse de la fluorescence, qui a notamment été décrit dans :
 - . l'article au nom de R.R. ALFANO et al., paru dans J. Quantum Electronics, 1984, vol. OE-20, 12, 1507-
15 1511, qui décrit la mesure de l'autofluorescence induite par une source laser, tant sur les tissus cancéreux que sur les tissus sains et qui montre que les profils spectraux des tissus cancéreux sont différents de ceux des tissus sains.
- 20 . et les méthodes par fluorescence provoquée, comme précisé dans l'article au nom de A.E. PROFIO et al., paru dans Med. Phys., 1984, 11, 4, 516-520, qui décrit un fluoromètre pour le diagnostic endoscopique de tumeurs. Plus précisément, un dérivé fluorescent de
25 l'hématoporphyrine est injecté, puis on caractérise la tumeur en détectant la fluorescence émise ; la source d'excitation est une lumière violette, acheminée à travers une fibre optique, jusqu'à l'endoscope, alors que la fluorescence émise ainsi que la lumière violette réflé-
30 chie sont collectées par une autre fibre optique. La fluorescence en lumière rouge et en lumière violette sont séparées à l'aide d'un miroir dichroïque et d'un filtre, et détectées à l'aide de photomultiplicateurs. Cette méthode a l'inconvénient de localiser difficilement les
35 petites tumeurs, d'être absolument dépendante des conditions de mesure et le gradient de concentration entre

tissus sain et tumoral est faible avec, de plus, un risque de phototoxicité cutanée.

Les méthodes de diagnostic de tumeurs, par fluorescence, proposées dans l'Art antérieur, ont, de plus, l'inconvénient majeur d'être des techniques abso-
lues, qui entraînent de nombreux faux positifs ou faux négatifs, car elles sont dépendantes des conditions de mesure (position des fibres de recueil, par exemple ou structure du tissu à étudier).

La présente invention s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à un dispositif et à un procédé qui permettent de résoudre le problème de la détection d'une tumeur difficilement détectable par les méthodes de l'Art antérieur ou dont les résultats sont difficilement interprétables, et également de résoudre le problème de la dépendance vis-à-vis des conditions de mesure, rencontrée dans les systèmes proposés dans l'Art antérieur (A.E. PROFIO et al.) ; en effet, la résolution de ce problème est cruciale pour l'obtention de résultats qui sont fiables et permettent d'éviter les faux positifs et les faux négatifs.

Les Inventeurs ont, pour ce faire, utilisé les mesures du métabolisme cellulaire et plus particulièrement la mesure du pH intracellulaire à l'aide de marqueurs fluorescents à spectres dépendants du pH, comme cela a notamment été précisé dans J.A. THOMAS et al., (Biochem., 1979, 18, 2210-2218), qui décrit les caractéristiques spectrales de la fluorescéine et de la 6-carboxyfluorescéine (6-CF), qui sont dépendantes du pH, dans le but de détecter la présence éventuelle d'une tumeur. L'absorbance à 490 nm (pic) en référence à l'absorbance à 465 nm (point isosbestique, c'est-à-dire indépendant du pH) montre que l'absorbance est plus importante à pH 7,8 qu'à pH 6,25.

La présente invention a pour objet un dispositif de mesure du pH d'une cible appropriée, sans contact

direct avec ladite cible, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une source lumineuse convenable pour la sélection d'au moins deux longueurs d'onde d'excitation de la fluorescence d'un marqueur fluorescent fixé sur ladite cible et dont le spectre d'émission de fluorescence est dépendant du pH, laquelle source est associée à un commutateur ou moyen de bascule d'une longueur d'onde d'excitation à l'autre ;
 - au moins un moyen de transmission de ladite source lumineuse à la cible ;
 - au moins un moyen de recueil de la fluorescence émise ;
 - un moyen de détection et de lecture de la fluorescence émise ; et
 - un système de calcul du pH de la cible à partir du rapport des signaux de fluorescence émise, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes d'excitation.
- Selon un mode de réalisation avantageux dudit dispositif, le moyen de transmission de la source lumineuse comprend au moins une fibre optique.
- Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit dispositif, le moyen de recueil de fluorescence comprend au moins une fibre optique.
- On entend, par fibre optique, au sens de la présente invention, toute fibre en matière diélectrique, destinée à guider des ondes électromagnétiques, visibles ou infrarouges, par exemple.
- Conformément à l'invention ledit moyen de transmission et/ou ledit moyen de recueil sont associés à un endoscope, couplé à un intensificateur d'image, lui-même relié à une caméra vidéo.
- On entend, par endoscope, au sens de la présente invention, aussi bien les endoscopes classiques, c'est-à-dire les appareils destinés à éclairer et à

rendre visible l'intérieur d'une cavité du corps humain que les fibroscopes, c'est-à-dire les endoscopes souples formés d'un faisceau de fibres optiques extrêmement fines.

5 Selon une disposition avantageuse de ce dernier mode de réalisation, ledit moyen de transmission et/ou ledit moyen de recueil sont inclus dans l'endoscope.

10 Un tel dispositif permet d'obtenir à la fois une image de fluorescence et une image visible de ladite cible.

 Le moyen de mesure des signaux de fluorescence émis par la cible marquée, est avantageusement un spectrophotomètre, et comprend notamment au moins un filtre
15 optique, au moins un photomultiplicateur et/ou au moins un photodétecteur de conversion desdits signaux lumineux, et un moyen d'acheminement des signaux électriques correspondants vers le système de calcul du pH.

 Les marqueurs fluorescents sensibles au pH
20 sont plus particulièrement décrits dans l'article paru au nom de R.Y. TSIEN (Methods in cell Biology, 1989, 30, 127-156), dans lequel il est notamment précisé que les marqueurs fluorescents suivants : la fluorescéine, la fluorescéine conjuguée au dextran ou à une autre molécule
25 inerte (DF), la 5 et/ou 6 carboxyfluorescéine (CF), le 2',7'-bis(carboxyéthyl)-5 et/ou 6-carboxyfluorescéine (BCECF) et leurs esters, la pyramine (8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonate), le 4-méthylumbelliférone ou 4-méthyl-7-hydroxycoumarine (4-MU), le 3,6 dicyano-
30 hydroquinone (DHPN), le SNARF-1 et le SNAF-2 (respectivement le semi-naphtorhodofluor et la semi-naphtofluorescéine), présentent une paire de longueurs d'onde dont le rapport d'excitation augmente avec le pH.

 Ces marqueurs permettent notamment de mesurer
35 le pH du cytosol.

Conformément à l'invention, le marqueur fluorescent est avantageusement associé à des liposomes et/ou des anticorps monoclonaux appropriés.

Selon un autre mode de réalisation du dispositif conforme à l'invention, le système de calcul du pH comprend avantageusement un moyen de calcul du rapport des signaux de fluorescence émise, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes d'excitation, et un moyen de lecture du pH correspondant au rapport obtenu, sur une courbe d'étalonnage dudit marqueur, en fonction du pH.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit système de calcul comprend également un système de contrôle du moyen de bascule.

Un tel système est notamment représenté par un microordinateur approprié, qui permet à la fois d'obtenir le pH en fonction des rapports de signaux de fluorescence émise et de contrôler le moyen de bascule d'une longueur d'onde d'excitation à une autre.

Lorsque la cible est une cellule, un tissu ou un organe, le dispositif conforme à l'invention présente les avantages suivants :

- la mesure du pH est réalisée, *in situ*, sans contact direct avec lesdits cellule, tissu ou organe ;
- cette mesure de pH permet la détection d'une tumeur, car les cellules tumorales présentent un pH plus acide que les cellules normales, dans la mesure où les cellules tumorales sont généralement anoxiques et ont donc recours à la glycolyse anaérobie, avec pour conséquence la production d'acide lactique ;
- cette mesure du pH est fiable, car elle utilise un rapport d'intensités de fluorescence à deux longueurs d'ondes différentes, ce qui évite la dépendance vis-à-vis des paramètres de mesure, (structure de la cible, angle entre la fibre de recueil et la fluorescence émise par la cible, notamment), souvent importante dans

les mesures de fluorescence et ce qui permet d'obtenir des signaux de bonne qualité et éventuellement de les amplifier.

La présente invention a également pour objet
5 un dispositif pour le traitement des tumeurs par hyperthermie et le contrôle de l'hyperthermie, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif de mesure de pH conforme à l'invention, associé à un moyen de chauffage approprié de ladite tumeur.

10 Ledit moyen de chauffage est avantageusement choisi parmi l'un quelconque des moyens suivants : source laser, micro-ondes, ultra-sons, radiofréquence ou circuit d'eau chaude.

Conformément à l'invention, ledit moyen de
15 chauffage est notamment associé à un moyen de focalisation de la chaleur produite, vers la tumeur, notamment une sonde, un cathéter ou une antenne extérieure.

La présente invention a également pour objet
un procédé d'utilisation du dispositif conforme à
20 l'invention, permettant d'obtenir les informations caractéristiques de l'évolution dans le temps du pH d'une cible appropriée, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de la cible à analyser avec un marqueur fluorescent, présentant, au moins deux
25 pics d'excitation et un pic d'émission et dont le spectre d'émission est dépendant du pH ;

- l'excitation de la cible ainsi traitée, successivement auxdites longueurs d'onde d'excitation dudit marqueur fluorescent ;

- la mesure de la fluorescence émise par
30 ladite cible à analyser, successivement auxdites longueurs d'onde d'excitation ; et

- le calcul du pH de ladite cible à analyser à partir du rapport des signaux de fluorescence émis, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs
35 d'onde d'excitation, par la lecture du pH correspondant

au rapport obtenu, sur une courbe d'étalonnage dudit marqueur, en fonction du pH.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, préalablement à la mise en contact de la
5 cible à analyser avec le marqueur fluorescent, ladite cible est mise en contact avec un sucre, notamment du glucose.

La mise en contact de la cible avec le sucre rend le procédé encore plus sensible, dans la mesure où
10 il permet de diminuer encore le pH des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains et donc d'augmenter ainsi la différence entre tissu tumoral et tissu sain.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, le marqueur fluorescent est notamment
15 choisi dans le groupe qui comprend la fluorescéine, la fluorescéine conjuguée au dextran ou à une autre molécule inerte (DF), la 5 et/ou 6 carboxyfluorescéine (CF), le 2',7'-bis(carboxyéthyl)-5 et/ou 6-carboxyfluorescéine (BCECF) et leurs esters, la pyramine (8-hydroxypyrrène-
20 1,3,6-trisulfonate), le 4-méthylumbelliférone ou 4-méthyl-7-hydroxycoumarine (4-MU), le 3,6 dicyano-hydroquinone (DHPN), le SNARF-1 et le SNAF-2 (respectivement le semi-naphtorhodofluor et la semi-naphtofluorescéine).

25 Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, ledit marqueur fluorescent est associé à des liposomes et/ou des anticorps monoclonaux appropriés.

Les dispositifs et le procédé conformes à
30 l'invention s'appliquent de manière particulièrement avantageuse à la mesure du pH de tumeurs, notamment accessibles uniquement par voie endoscopique et permettent de suivre le pH de la tumeur en différents points et l'évolution du traitement par hyperthermie desdites
35 tumeurs, ce qui rend possible le calcul de la dose thermique utile, en n'importe quel point de la tumeur ; en

effet, la dose thermique à appliquer est différente selon le pH.

Le dispositif conforme à l'invention permet également le contrôle en temps réel de la dose thermique
5 à appliquer.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé
10 conforme à l'invention et à une description détaillée du dispositif selon l'invention, avec référence aux dessins annexés, dans lesquels :

- les figures 1 et 2 représentent schématiquement deux mode de réalisation d'un dispositif de mesure
15 du pH conforme à l'invention ;

- la figure 3 représente le profil cinétique de fluorescence de deux cibles saines (S_1 et S_2) ;

- la figure 4 représente l'effet du 5,6-CF sur les valeurs du rapport d'intensités de fluorescence d'émission de deux zones saines de la peau, calculé à
20 partir des intensités de fluorescence obtenues à 490 et 465 nm ;

- la figure 5 représente le profil cinétique de fluorescence de tissus normaux et tumoraux après une
25 injection de 250 μ l de 5,6-CF à 10^{-3} M ;

- la figure 6 représente l'effet d'un tissu sain ou d'un tissu tumoral sur les valeurs des rapports d'intensités de fluorescence, calculés à partir des intensités obtenues à 490 et 465 nm ;

- la figure 7 représente l'évolution du spectre d'émission de fluorescence du 5,6-CF en fonction du pH ;
30

- la figure 8 représente la courbe de calibration de la 6 CF en fonction du pH ;

- la figure 9 montre l'influence du pH sur un
35 traitement par hyperthermie.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

5 La figure 1 représente une vue schématique d'un dispositif de mesure de pH conforme à l'invention, comprenant :

 - une source d'excitation 10, qui dans la réalisation représentée, et ce de manière non limitative, comporte une lampe à arc USHIO 155 XENON (USHIO, JAPON) 101, un miroir sphérique de rayon de courbure 3 cm 102, un condenseur 66061 ORIEL 103 (ORIEL, USA), une lentille convergente de diamètre 7,5 cm et de distance focale 200 mm 104, et des filtres interférentiels 105 centrés
15 sur 450 nm, 465 nm, 490 nm et 500 nm, permettant de sélectionner les longueurs d'onde désirées ; un moyen de bascule 106 ou commutateur permet de basculer d'une longueur d'onde d'excitation à une autre ; une dernière lentille 20, de diamètre 22,4 mm permet de focaliser la
20 lumière sur le coeur d'une fibre 600 µm de transmission 30 (O.N. = 0,48). La puissance délivrée est de 3 mW sur une bande de 10 nm. La fibre de transmission est au contact de la cible 40, notamment un tissu, dont le pH est à analyser *in situ* ;

25 - une fibre de recueil 50, d'un diamètre de 600 µm, est connectée à un monochromateur MC1-03 (OPTOMETRICS, USA) 60 relié, à un photomultiplicateur 70 (MINI-CHROM ; bande 300 nm à 800 nm) ;

 - la lecture du signal s'effectue, dans la
30 réalisation représentée sur un voltmètre DIPITOL 80 ;

 - le système de calcul est représenté par un microordinateur 90, auquel sont reliés le système de recueil (fibre de recueil 50, monochromateur 60 et photomultiplicateur 70) et le moyen de bascule 106.

35 Le système de calcul permet le calcul du rapport des signaux de fluorescence émise obtenus à deux

longueurs d'excitation appropriées au marqueur utilisé, puis le calcul du pH de la cible 40 correspondant au rapport obtenu, sur une courbe d'étalonnage dudit marqueur en fonction du pH.

5 La figure 2 représente une vue schématique d'un dispositif de mesure de pH conforme à l'invention, dans lequel la fibre de recueil 50' est incluse dans un endoscope 51 qui permet ainsi d'obtenir à la fois une image de fluorescence et une image dans le visible.

10 Le dispositif représenté à la figure 2 comprend :

 . une source d'excitation de fluorescence 10', dont les caractéristiques peuvent être identiques à celle de la source décrite à l'exemple 1, qui est associée à un
15 commutateur de longueur d'onde d'excitation 106', qui peut avantageusement être contrôlé par un ordinateur 901 ; le commutateur 106' est relié à la cible 40' par l'intermédiaire d'une fibre de transmission 30' de même type que celle de l'exemple 1 ;

20 . un endoscope 51, qui comprend une source lumineuse 501, un obturateur 502 et un faisceau de fibres appropriées 503 ;

 . une fibre de recueil 50', qui est incluse dans un endoscope 51, est associée à un filtre 61 de
25 sélection de la longueur d'onde d'émission (515 nm, lorsque le marqueur est la 6-CF, par exemple) ou à un monochromateur ; elle est couplée d'une part à un intensificateur d'image 52, lui-même relié à une caméra 53 et d'autre part à une caméra vidéo 54, qui permet
30 l'obtention d'une image de la cible.

Les signaux de fluorescence (image de fluorescence) et l'image dans le visible sont dirigées vers le microordinateur 901.

Le système de recueil (fibre de recueil 50',
35 filtre 61 ou monochromateur, intensificateur d'image 52, caméra 53), l'endoscope 51, la caméra vidéo 54 et

l'ordinateur 901 constituent un système d'imagerie qui permet à la fois le stockage d'images et de spectres de fluorescence.

Les dispositifs conformes à l'invention, permettent la mesure du pH d'une cible.

On procède comme suit : la mesure est réalisée sur des souris CDF porteuses d'une leucémie lymphoïde P388.

La tumeur est greffée en sous-cutané sur un côté de la souris.

L'évolution spontanée de la tumeur est reproductible : une tumeur d'un diamètre de 20 mm est obtenue 12 jours après la greffe.

Une injection intrapéritonéale de 250 μ l de 5,6-CF dans un tampon NaCl 0,9 % à une concentration de 10^{-3} M, 5.10^{-3} M ou 10^{-4} M (5 mg/kg, 2,5 mg/kg ou 0,5 mg/kg), est réalisée au jour 12.

Avant de mesurer la fluorescence et de calculer le pH de la tumeur, la zone tumorale et un tissu sain correspondant sont rasés.

L'injection de 5,6 CF étant considérée comme le temps zéro, les intensités de fluorescence sont mesurées aux temps -3 minutes, +3 minutes, puis toutes les 10 minutes, pendant 1 heure.

Des essais contrôles sont réalisés sur la peau normale et sur des tumeurs, n'ayant pas été mises en contact avec le marqueur fluorescent.

La figure 3, qui comporte en abscisse, le temps en minutes et en ordonnées, les intensités de fluorescence, montre les différents profils cinétiques entre deux zones de tissus sains (S1 et S2). Les intensités de fluorescence maximales peuvent être relativement différentes ; les intensités maximales sont atteintes en 5 à 30 minutes, mais sont différentes pour chaque tissu. Les différences dans les profils cinétiques peuvent être dues notamment à des perturbations dans les conditions de

détection dans les deux zones. Les courbes 1 et 2 montrent les profils cinétiques du tissu S2, respectivement à 465 et 490 nm et les courbes 3 et 4 montrent les profils cinétiques du tissu S1, respectivement à 465 et à
5 490 nm.

La figure 4 montre que quelles que soient les intensités de fluorescence dans les deux zones, les différences n'affectent pas les valeurs des rapports, qui restent constants et sont quasiment identiques pour les
10 deux zones S1 et S2 entre 15 min et 50 min après l'injection.

La figure 5 montre les intensités de fluorescences obtenues en fonction du temps, sur un tissu sain (-□-) et sur un tissu tumoral (-■-). Cette figure donne
15 les profils cinétiques obtenus après injection de CF à 10^{-3} M. La fluorescence des tissus normaux est supérieure à celle des tissus tumoraux.

La figure 6 montre les valeurs des rapports I490/I465 et montrent qu'il existe bien une différence
20 significative entre les tissus sains et les tissus tumoraux.

Les résultats montrent que la pénétration de la lumière d'excitation est suffisante pour détecter les variations spectrales de fluorescence par la méthode des
25 rapports et permettent d'obtenir la valeur du pH au niveau de la tumeur ; en effet, la figure 7 montre l'évolution du spectre d'émission de fluorescence de la carboxyfluorescéine en fonction du pH et la figure 8 montre la courbe d'étalonnage de la 5,6 CF en fonction du
30 pH.

Le procédé conforme à l'invention permet également d'évaluer la dose thermique (durée et temps) nécessaire pour détruire des cellules tumorales en fonction du pH desdites cellules.

La figure 9 montre l'influence du pH sur la résistance de cultures de cellules soumises à une hyperthermie.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède,
5 l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent
10 venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDICATIONS

1. Dispositif de mesure du pH d'une cible appropriée sans contact direct avec ladite cible, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 - une source lumineuse (101) convenable pour la sélection d'au moins deux longueurs d'onde d'excitation de la fluorescence d'un marqueur fluorescent fixé sur ladite cible et dont le spectre d'émission de fluorescence est dépendant du pH, laquelle source est
- 10 associée à un moyen de bascule (106, 106') d'une longueur d'onde d'excitation à l'autre ;
 - au moins un moyen de transmission (30, 30') de ladite source lumineuse à la cible (40, 40') ;
 - au moins un moyen de recueil (50, 50') de la
 - 15 fluorescence émise ;
 - un moyen de détection et de lecture de la fluorescence émise (60, 70, 80 ; 61,52,53) ; et
 - un système de calcul du pH de la cible à partir du rapport des signaux de fluorescence émise,
 - 20 obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes d'excitation (90, 901).

2. Dispositif selon la revendication 1; caractérisé en ce que le moyen de transmission de la source lumineuse comprend au moins une fibre optique.

25 3. Dispositif selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que le moyen de recueil de fluorescence comprend au moins une fibre optique.

4. Dispositif selon l'une quelconque des

30 revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit moyen de transmission et/ou ledit moyen de recueil sont associés à un endoscope (51), couplé à un intensificateur d'image (52), lui-même relié à une caméra vidéo (53).

5. Dispositif selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit moyen de transmission et/ou ledit

35 moyen de recueil sont inclus dans l'endoscope.

6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est avantageusement associé à des liposomes et/ou des anticorps monoclonaux appropriés.

5 7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le système de calcul du pH comprend avantageusement un moyen de calcul du rapport des signaux de fluorescence émise, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'ondes
10 d'excitation, et un moyen de lecture du pH correspondant au rapport obtenu, sur une courbe d'étalonnage dudit marqueur, en fonction du pH.

8. Dispositif selon la revendication 7, caractérisé en ce que le système de calcul comprend également
15 un système de contrôle du moyen de bascule.

9. Dispositif pour le traitement des tumeurs par hyperthermie et le contrôle de l'hyperthermie, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif de mesure de pH selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, associé
20 à un moyen de chauffage approprié de ladite tumeur.

10. Dispositif selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit moyen de chauffage est associé à un moyen de focalisation de la chaleur produite, notamment une sonde, un cathéter ou une antenne exté-
25 rieure.

11. Procédé d'utilisation du dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, permettant d'obtenir les informations caractéristiques de l'évolution dans le temps du pH d'une cible appropriée,
30 caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de la cible à analyser avec un marqueur fluorescent, présentant, au moins deux pics d'excitation et un pic d'émission et dont le spectre d'émission est dépendant du pH ;

- l'excitation de la cible ainsi traitée, successivement auxdites longueurs d'onde d'excitation dudit marqueur fluorescent ;

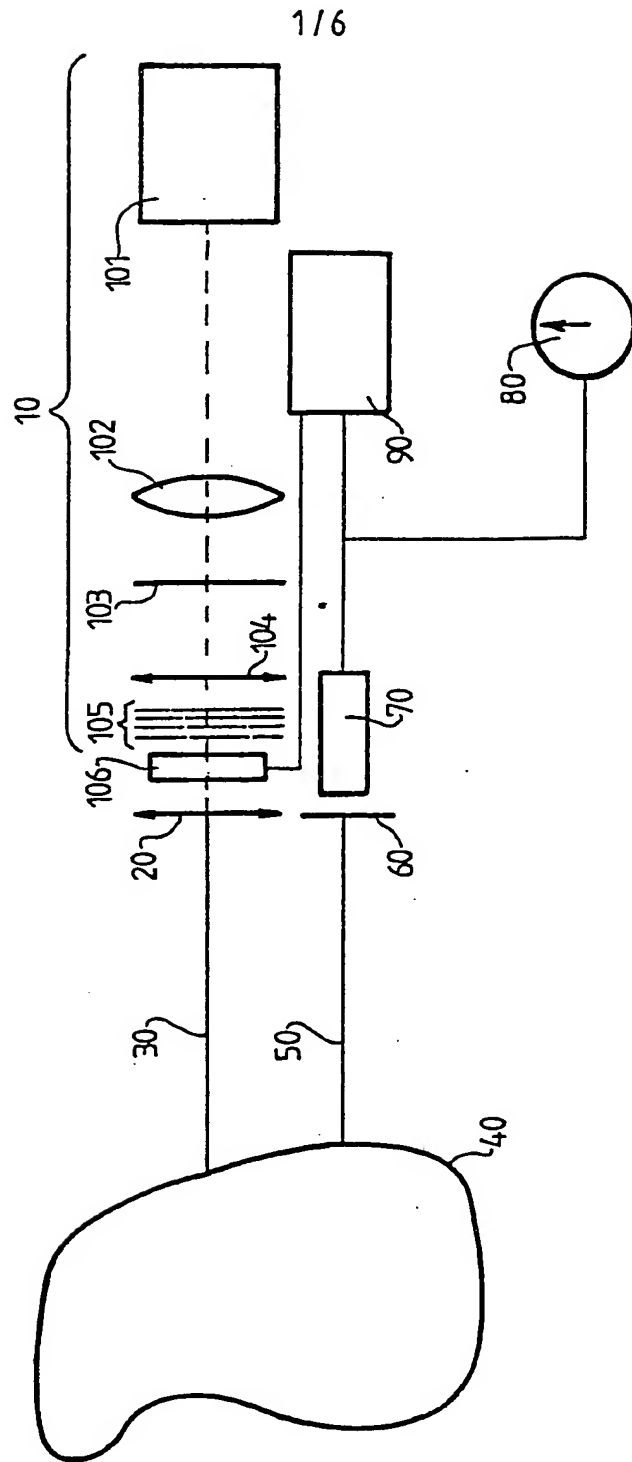
- la mesure de la fluorescence émise par ladite cible à analyser, successivement auxdites longueurs d'onde d'excitation ; et

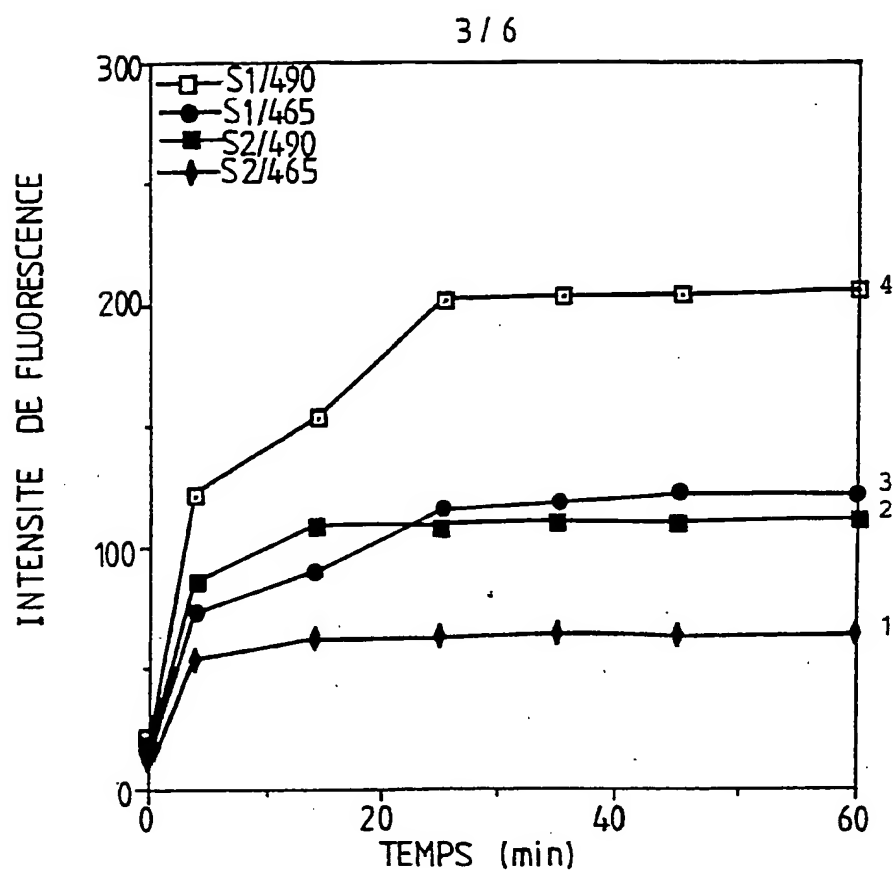
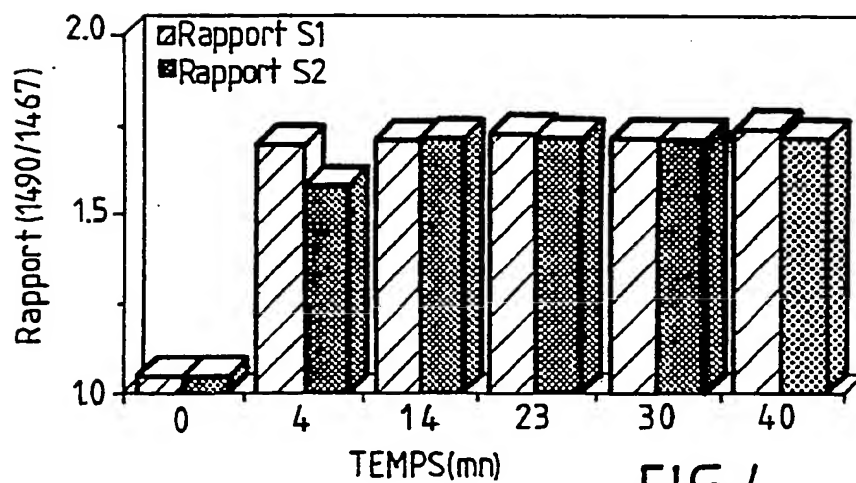
- le calcul du pH de ladite cible à analyser à partir du rapport des signaux de fluorescence émis, obtenus successivement au moins auxdites deux longueurs d'onde d'excitation, par la lecture du pH correspondant au rapport obtenu, sur une courbe d'étalonnage dudit marqueur, en fonction du pH.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que préalablement à la mise en contact de la cible à analyser avec le marqueur fluorescent, ladite cible est mise en contact avec un sucre, notamment du glucose.

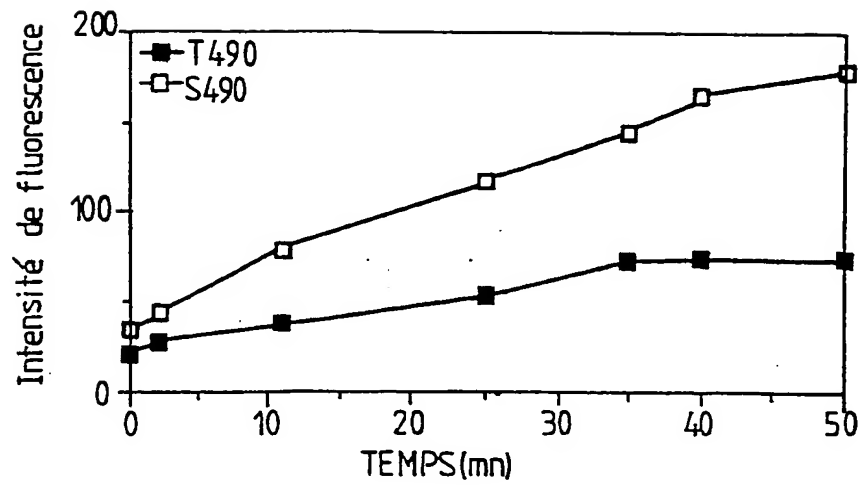
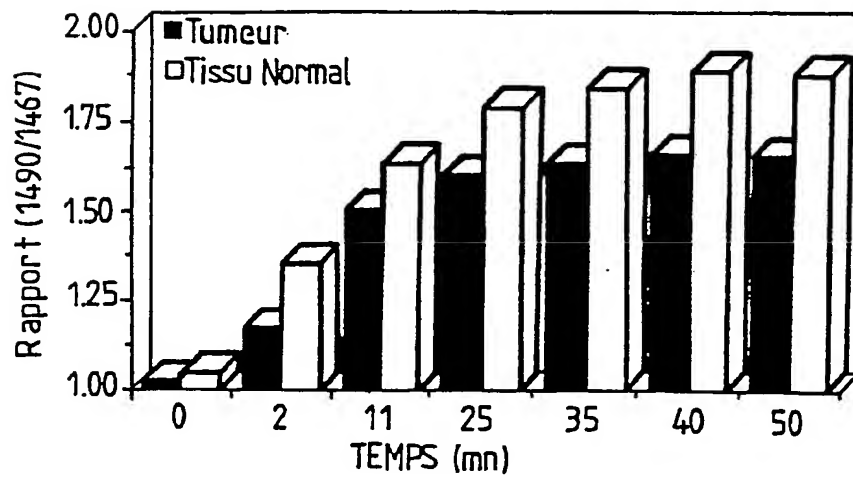
13. Procédé selon la revendication 11 ou la revendication 12, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est notamment choisi dans le groupe qui comprend la fluorescéine, la fluorescéine conjuguée au dextran ou à une autre molécule inerte (DF), la 5 et/ou 6 carboxyfluorescéine (CF), le 2',7'-bis(carboxyéthyl)-5 et/ou 6-carboxyfluorescéine (BCECF) et leurs esters, la pyramine (8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonate), le 4-méthylumbelliférone ou 4-méthyl-7-hydroxycoumarine (4-MU), le 3,6 dicyanohydroquinone (DHPN), le SNARF-1 et le SNAF-2 (respectivement le semi-naphtorhodofluor et la semi-naphtofluorescéine).

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit marqueur fluorescent est associé à des liposomes et/ou des anticorps monoclonaux appropriés.

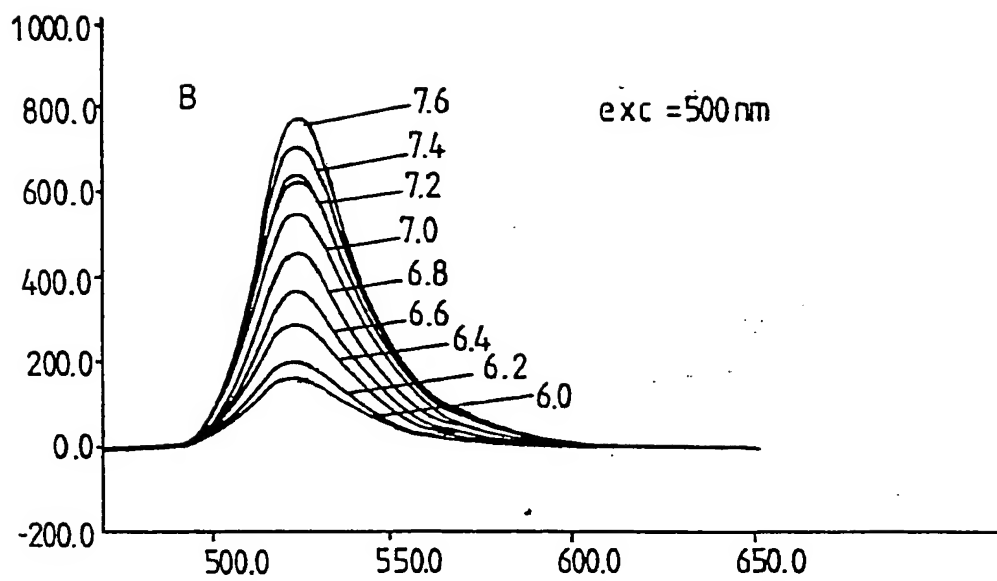
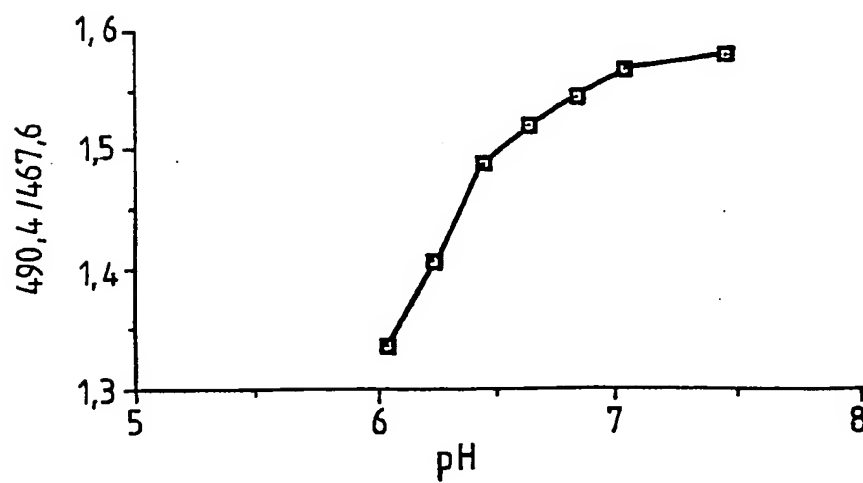


FIG.3FIG.4

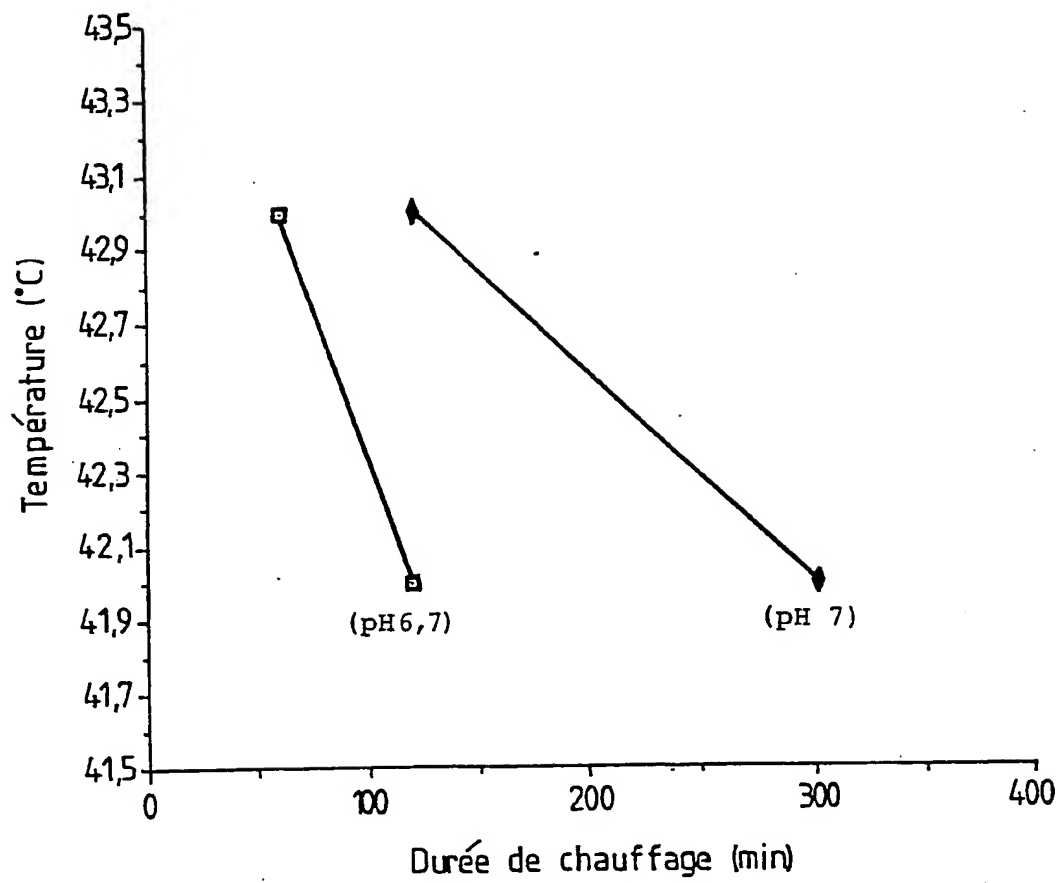
4/6

FIG.5FIG.6

5/6

FIG.7FIG.8

6/6

FIG.9

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9100064
FA 451867

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	US-A-4 768 513 (S. SUZUKI) * colonnes 1,2; colonne 7, revendications 11-13; figure 4 * ---	1-5,9, 11
Y	MEDICAL & BIOLOGICAL ENGINEERING & COMPUTING vol. 25, no. 6, novembre 1987, pages 597-604, Stevenage, Herts, GB; M.J. MARTIN et al.: "Fibre-optics and optical sensors in medicine" * page 597; page 601, paragraphe 6.1 * ---	1-5,9, 11
A,D	D. LANSING TAYLOR et al.: "METHODS IN CELL BIOLOGY" vol. 30, partie B, pages 127-156, 1989, Academic Press * pages 131-140 * ---	13
Y	GB-A-2 126 717 (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) * document entier * ---	1-5,9, 11
Y	IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING vol. BME-33, no. 2, février 1986, pages 117-132; J.L. GEHRICH et al.: "Optical Fluorescence and Its Application to an Intravascular Blood Gas Monitoring System" * page 120; figure 6 * ---	1-5,9, 11
A	US-A-4 973 848 (A.S. KOLOBANOV et al.) * colonne 11, ligne 62 - colonne 12, ligne 43 * ---	9,10
A	WO-A-8 404 665 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) * document entier * ---	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		G 01 N A 61 B A 61 N G 02 B
Date d'achèvement de la recherche 20-09-1991		Examineur BRISON O.P.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9100064
FA 451867

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée		
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes			
A	WO-A-9 010 219 (ANDERSSON-ENGELS et al.) * document entier * -----	1		
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL5)		
Date d'achèvement de la recherche 20-09-1991		Examinateur BRISON O.P.		
<table><tr><td>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</td><td>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant</td></tr></table>			CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant			